

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 5/00, A61K 39/12	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/09935 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Juli 1991 (11.07.91)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT90/00128		(74) Anwalt: WOLFRAM, Gustav; Schwindgasse 7, P.O. Box 205, A-1041 Wien (AT).
(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Dezember 1990 (21.12.90)		
(30) Prioritätsdaten: A 2928/89 22. Dezember 1989 (22.12.89) AT		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent), SU, US.
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestraße 67, A-1221 Wien (AT).		
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): MUNDT, Wolfgang [AT/AT]; Florianigasse 57/6, A-1080 Wien (AT). BARRETT, Noel [IE/AT]; Steinwandgasse 6A, A-3400 Klosterneuburg/Weidling (AT). DORNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: MATRIX WITH ADHERENTLY BOUND CELLS AND PROCESS FOR PRODUCING VIRUSES/VIRUS ANTIGENS

(54) Bezeichnung: MATRIX MIT DARAN ADHÄRENT GEBUNDENEN ZELLEN, SOWIE VERFAHREN ZUR PRODUKTION VON VIRUS/VIRUSANTIGEN

(57) Abstract

A matrix or substrate bears adherently bound human or animal cells infected with a virus. It has been shown that surface dependent cells useful for virus multiplication remain adherently bound to a matrix even when infected with a virus, produce virus antigens over a relatively long period of time and release them in the culture medium. In order to produce early Summer meningo-encephalitis (FSME) virus antigens by cultivating the FSME virus in cell cultures, a surface dependent permanent cell line, preferably the vero-cell line ATTC CCL 81, is inoculated with the FSME virus and the cells are bound to substrates and kept in a non lytic serum free system in conditions that ensure cellular growth, so that antigens are produced. The antigen-containing medium is then separated from the substrate bound cells and processed in a known manner by concentration, inactivation and purification until a galenically acceptable composition is obtained.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung besteht in einer Matrix, also einem Trägermaterial, mit daran adhären gebundenen menschlichen oder tierischen Zellen, wobei die Zellen mit Virus infiziert sind. Es hat sich gezeigt, daß oberflächenabhängige Zellen, die zur Virusvermehrung geeignet sind, selbst in virusinfiziertem Zustand an einer Matrix adhären gebunden bleiben, über relativ lange Zeit kontinuierlich Virusantigen produzieren und in das Kulturmedium abgeben. Zur Produktion von Frühsommer-Meningoenzephalitis-(FSME)-Virus-Antigen durch Züchten des FSME-Virus in Zellkulturen wird eine oberflächenabhängige permanente Zelllinie, vorzugsweise die Vero-Zelllinie ATTC CCL 81, mit dem FSME-Virus beimpft und die Zellen unter Aufrechterhaltung des Zellwachstums in einem nicht-lytischen serumfreien System an Trägern gebunden gehalten, um eine Antigenbildung aufrecht zu erhalten, worauf das antigenhaltige Medium von den trägegebundenen Zellen getrennt und in bekannter Weise durch Aufkonzentrieren, Inaktivieren und Reinigen zu einem galenisch akzeptablen Präparat aufgearbeitet wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BC	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Matrix mit daran adhärent gebundenen Zellen, sowie Verfahren zur Produktion von Virus/Virusantigen

Die Erfindung betrifft eine Matrix mit daran adhärent gebundenen menschlichen oder tierischen Zellen, sowie ein Verfahren zur Produktion von Virus/Virusantigen, insbesondere von Frühsommer-Meningoenzephalitis-(FSME)-Virus-Antigen.

Infektionen mit dem Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) werden seit dem 2. Weltkrieg in Europa beobachtet. In Österreich, in Süddeutschland und in der Tschechoslowakei werden jedes Jahr mehrere hundert Patienten aufgrund einer FSME-Infektion stationär behandelt.

Das FSME-Virus wird der Familie der Flaviviren zugeordnet, der früheren serologischen Gruppe B der Arboviren, die einen Genus der Virusfamilie Togaviridae darstellt.

Gegen eines der wichtigsten und häufigsten Enzephalitis-Erreger beim Menschen, das Japanische Encephalitis-B-Virus, gibt es seit längerer Zeit Totimpfstoffe. Diese Totimpfstoffe werden aus dem Gehirn infizierter Mäuse gewonnen, gereinigt, und sind als sicher und wirksam anerkannt (Hoke et al., N Engl J Med., 319, 608 (1988)).

Seit dem Jahr 1976 ist ein Impfstoff gegen FSME verfügbar und von den Gesundheitsbehörden zugelassen. Zur Herstellung dieses Impfstoffes wird das Virus im Gehirn infizierter Baby-Mäuse angezüchtet, in Hühnerembryonalzellen vermehrt, mit Formalin inaktiviert und dann einem effizienten Reinigungsverfahren unterworfen (Heinz et al., J. Med. Virol., 6, 103 (1980)).

In der Literatur werden eine Reihe von Möglichkeiten zur Vermehrung von Arboviren im Hinblick auf eine mögliche Impfstoffherstellung beschrieben. Die heute am meisten verwendete Methode ist die Beimpfung von

Hühnerembryonalfibroblasten mit einem aus dem Maushirn gewonnenen FSME-Saatvirus und die Kultivierung der beimpften Zellen. Diese Methode erfordert eine aufwendige Reinigung des Antigens, um komplexe, heterologe biologische Material zu entfernen und um bei wiederholter Verabreichung von daraus gewonnenen Impfstoffdosen einen sensitivierenden Effekt bei den Impflingen zu vermeiden.

Für die Bereitstellung der Hühnerembryonalzellen muß von SPF (= specific pathogen free)-Eiern ausgegangen werden. Diese SPF-Eier müssen zur Aufrechterhaltung ihres SPF-Status vor jeder Verwendung einer Vielzahl von langwierigen Untersuchungen unterzogen werden.

Weiters zeigen Hühnerembryonalzellkulturen nur geringe Generationszahlen bei der Weiterzucht, wodurch der Chargengröße Grenzen gesetzt sind, ein schwieriges Sterilhalten der Primärkulturanzucht und keine Konstanz der Qualität der primären Zellen in bezug auf Virusvermehrung und Antigenproduktion.

Diese Nachteile bestehen nicht nur bei den Verfahren zur Produktion von FSME-Virusantigen, sondern bei der Antigenherstellung ganz allgemein.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, die Produktion von Virus/Virusantigen, insbesondere von FSME-Virus/Virusantigen, so zu verbessern, daß die oben genannten Nachteile beseitigt werden und ein Verfahren zur Züchtung von Virus/Virusantigen in Zellkulturen zur Verfügung zu stellen, das insbesondere eine Produktion im großtechnischen Maßstab erlaubt, wobei gleichzeitig die Kultur auf einfache Weise steril gehalten werden kann. Weiters soll die Abgabe unerwünschter zellulärer Proteine in den Kulturüberstand minimiert werden.

Zur Lösung der beschriebenen Aufgabe wird eine Matrix zur Verfügung gestellt, d.h. ein Trägermaterial, mit daran adharent gebundenen menschlichen oder tierischen Zellen, wobei die Zellen mit Virus infiziert sind. Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß oberflächenabhängige Zellen, die zur Virusvermehrung geeignet sind, selbst in virusinfiziertem Zustand an einer Matrix adharent gebunden bleiben, über relativ lange Zeit kontinuierlich Virusantigen produzieren und in das Kulturmedium abgeben.

Es ist möglich, die mit infizierten Zellen beladene erfindungsgemäße Matrix einige Tage bei einer Temperatur zwischen 0°C und 8°C aufzubewahren, also unter Bedingungen, bei denen der Zellmetabolismus und damit die Virusproduktion unterbunden sind. Eine derartig aufbewahrte Matrix kann in der Folge problemlos durch Einbringen in ein Kulturmedium und Einstellen der jeweiligen Kultivierungsbedingungen zur Virusantigenproduktion verwendet werden. Die erfindungsgemäße Matrix stellt somit eine Ausgangskultur dar, die mit konstanter Qualität und Aktivität auf Vorrat produziert werden kann, deren Zustand hinsichtlich Sterilität leicht überprüfbar ist und die jederzeit zur Virusantigenproduktion herangezogen werden kann.

Die Bindung der antigenproduzierenden Zellen an den Träger gestattet weiters eine überaus einfache Handhabung der virusinfizierten und produktionsbereiten Zellen. So ist es beispielsweise möglich, die Virus/Virusantigenproduktion kontinuierlich in einem Perfusionsreaktor durchzuführen. Die Abtrennung der Zellen vom antigenhaltigen Medium wird durch ihre Bindung an die Matrix wesentlich erleichtert, wodurch die erfindungsgemäße Matrix die Produktion von Virus/Virusantigen im großtechnischen Maßstab vereinfacht.

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Matrix besteht darin, daß als adhären gebundene Zellen Vero-Zellen ATTC CCL 81 vorgesehen sind, welche vorzugsweise zur Produktion von Frühsommer-Meningo-enzephalitis-(FSME)-Virus-Antigen vorgesehen sind und daher mit FSME-Virus infiziert sind.

Die an der Matrix adharent gebundenen Zellen können aber auch mit Flavivirus oder mit Arenavirus infiziert sein.

Als Material für die Matrix hat sich Glas, quervernetztes Dextran, Gelatine oder Kunststoff als gut geeignet erwiesen, wobei die Matrix am besten als Microcarrier ausgebildet ist, dessen Teilchendurchmesser vorzugsweise im Bereich zwischen 100 μ m und 3000 μ m liegt. Diese Microcarrier können eine glatte Oberfläche oder eine poröse Strukturierung aufweisen.

Eine weitere zweckmäßige Ausführungsform der erfindungsgemäßen Matrix ist dadurch gekennzeichnet, daß an ihrer Oberfläche pro cm² zwischen 1x10⁵ und 4x10⁵ Zellen adharent gebunden sind.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Produktion von Frühsommer-Meningoenzephalitis-(FSME)-Virus-Antigen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Matrix, das dadurch gekennzeichnet ist, daß oberflächenabhängige permanente Zellen, vorzugsweise die Vero-Zellen ATTC CCL 81, mit dem FSME-Virus beimpft werden und die Zellen in einem serumfreien Medium unter Aufrechterhaltung ihrer Lebensfähigkeit an einer Matrix adharent gebunden gehalten werden, um eine Antigenbildung und eine Antigenabgabe an das Medium aufrecht zu erhalten, worauf das antigenhältige Medium von denträgergebundenen Zellen getrennt und in bekannter Weise durch Aufkonzentrieren, Inaktivieren und Reinigen zu einem gänisch akzeptablen Präparat aufgearbeitet wird.

Die Verozelllinie ATTC CCL 81 wird aus dem Nierengewebe der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen und kann in serumfreiem Medium metabolisch aktiv gehalten werden. Für eine solche permanente Zelllinie wird eine Muttersaatzellbank und eine Arbeitssaatzellbank einmal angelegt und alle Untersuchungen auf kontaminierende Substanzen durchgeführt. Diese permanente Zelllinie ist somit genau charakterisierbar nicht nur im Hinblick auf Freiheit von kontaminierenden Mikroorganismen, sondern auch auf Wachstumsverhalten, Anzucht, Vermehrungsverhalten und - wenn einmal optimiert - als konstant zu betrachten.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden vorzugsweise Verozellen verwendet, die auf Microcarriern gebunden sind. Dadurch kann eine hohe Zelldichte erreicht werden, die bei den bisher benutzten primären Zellkulturen weder in Rouxflaschen noch in Suspension erreichbar war und eine erhebliche Ausbeutesteigerung an Virus und an Virusantigen pro Fermentationsvolumen ermöglicht.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Virusvermehrung und Antigenbildung in einem kontinuierlich betriebenen Perfusionsreaktor während einer Dauer von mindestens 5 Tagen, bei einer Temperatur zwischen 34 und 37°C, durchgeführt wird, wobei die Perfusion mit einer Perfusionsrate von 0,3 bis 10 v/v/Tag durchgeführt werden kann. Im Perfusionsreaktor kann weiters eine Zelldichte von 2×10^9 bis 2×10^{10} Zellen pro Liter Fermentationsvolumen, letztere bei einem Fließbett-Fermenter, vorgesehen werden.

Die erfindungsgemäße Virusvermehrung in einer Perfusionskul-
tur ermöglicht eine im Vergleich zu einer chargenweisen
Kultivierung wesentliche Verkürzung der durch die Perfusi-
onsrate vorgegebenen Verweilzeit des Virus- und des Virusan-
tigens im Medium. Durch die kürzere Verweilzeit kommt es zu
einer weit geringeren thermischen Inaktivierung und damit zu

einer höheren Produktivität des erfindungsgemäßen Verfahrens. So kann im Perfusionsmedium eine Antigenkonzentration von 1 bis 10 µg/ml erreicht und aufrecht erhalten werden.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren können auf einfache Weise die zur Kultivierung optimalen Bedingungen eingestellt werden. Außerdem sind zur Durchführung wesentlich geringere Manipulationen erforderlich als bei allen bekannten Verfahren, was eine größere Sicherheit im Umgang mit dem infektiösem Material bedeutet und ein kontinuierliches rasches Aufarbeiten des Virus und der Virusantigene aus dem Kulturmedium ermöglicht.

Die Herstellung des Virusinokulums, die Anzucht der Zellen für die Virus- bzw. Virusantigenproduktion und die eigentliche Virus- bzw. Virusantigenproduktion werden nachstehend näher beschrieben.

1. Virusinokulum

Zellen (z.B. Vero ATTC CCL 81) werden in Rollerflaschen bei 37°C bis zur Konfluenz angezüchtet und mit 1 ml einer Saatvirussuspension infiziert. Ab dem 2. Tag nach Infektion wird täglich ein halber Medienwechsel mit serumfreiem Medium durchgeführt. Die Medienüberstände vom 4. bis zum 8. Tag enthalten $2-5 \times 10^7$ p.f.u. pro ml und werden bis zu ihrer Verwendung als Virusinokulum bei -20°C gelagert.

2. Anzucht der Zellen für Virus/Virusantigenproduktion

Ausgehend von den in Flüssigstickstoff gelagerten ATTC CCL 81 Arbeitssaatzellen, wird eine Vermehrung dieser Zellen in Gewebekulturflaschen durchgeführt bis eine Zellmenge erreicht ist, die es erlaubt, einen Fermenter zu inokulieren. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgt in Fermentationsgefäßern bei 37°C, wobei man den adhärent wachsenden Arbeitssaatzellen möglichst viel Oberfläche zum Anhaften zur

Verfügung stellen soll. Solche großen Oberflächen bieten sich in der Verwendung von Rollerflaschen aus Glas oder Polystyrol oder in der Verwendung von Microcarriern (MC) an. Am besten sind MC aus quervernetztem Dextran mit einer Größe zwischen 170 μ m und 250 μ m geeignet.

Die mit Saatzellen beladenen MC werden bei 37°C kultiviert bis eine Zelldichte von 1.10⁵ - 4.10⁵ Zellen pro cm² erreicht ist. Diese Zelldichte ist im allgemeinen nach sechs Tagen erreicht. Während der Kultivierung kommt es zu einer vollständigen Überwachung der Microcarrier mit Zellen, wobei schließlich einzelne Microcarrier über den auf ihrer Oberfläche haftenden Zellrasen miteinander zur Gruppenverwachsen können.

3. Virus/Virusantigenproduktion

Nachdem die angegebene Zelldichte erreicht wurde, werden zur Herstellung der erfindungsgemäßen Matrix die am MC gebundenen Zellen mit dem Virusinokulum infiziert (1-0,01 pfu/Zelle, bevorzugt 0,1 pfu/Zelle). Die erfindungsgemäße Matrix kann einige Tage bei einer Temperatur zwischen 0°C und 8°C gelagert werden oder sofort zur Virusantigenproduktion verwendet werden.

Zur Antigenproduktion werden die mit infizierten Zellen beladenen MC in einen Perfusionsreaktor eingebracht. Ab diesem Zeitpunkt der Virusinfektion wird in der Kultur nur serumfreies Medium verwendet, das kontinuierlich durch den Perfusionsreaktor gepumpt wird, während die auf den Microcarriern kultivierten Zellen mittels einer Rückhaltevorrichtung im Reaktor zurückgehalten werden. Im ablaufenden Kulturmedium befindet sich ab dem 2. Tag nach Infektion Virusantigen in hoher Konzentration und kann mindestens 10 Tage daraus kontinuierlich gewonnen werden.

Mit den nachfolgenden Beispielen wird das erfindungsgemäße Verfahren noch weiter erläutert. Die Bestimmung des Virusantigens erfolgte in allen Beispielen mit einem Antigen-ELISA.

Beispiel 1

Vero-Zellen ATCC CCL 81 wurden in einem 6-l-Fermenter auf Microcarrier (Cytodex 3 der Firma Pharmacia) bei 37° C bis zu einer Zellzahl von 2×10^6 pro ml Kulturmedium (DMEM = Dulbecco's Eagle Medium) kultiviert und

- a) mit FSME-Virus (0,1 pfu/Zelle) infiziert und die Virusvermehrung chargeweise durchgeführt

Tabelle 1

Tage nach Infektion	Virus/Virusantigen µg/ml
---------------------	-----------------------------

2	0,20
3	0,70
4	1,60
5	2,70
6	4,00
7	3,80
8	2,90

Die Produktivität betrug pro 1 Fermentationsvolumen 4mg Virus/Virusantigen.

- b) mit FSME-Virus (0,1 pfu/Zelle) infiziert und Kulturmedium (DMEM) kontinuierlich mit 0,5 Volumen/Fermentervolumen/Tag perfundiert

Tabelle 2

Tage nach Infektion

Virus/Virusantigen

 $\mu\text{g}/\text{ml}$

2	0,30
3	1,60
4	4,50
5	4,50
6	2,50
7	3,20
8	2,90
9	2,50
10	2,30

Die Produktivität betrug pro 1 Fermentationsvolumen
13,7 mg Virus/Virusantigen.

- c) mit FSME-Virus (0,1 pfu/Zelle) infiziert und Kulturmedium (DMEM) kontinuierlich mit 1 Volumen/Fermentervolumen/Tag perfundiert

Tabelle 3

Tage nach Infektion

Virus/Virusantigen

 $\mu\text{g}/\text{ml}$

2	0,45
3	1,40
4	2,00
5	2,00
6	1,70
7	1,60
8	1,10
9	1,10
10	0,90

Die Produktivität betrug pro 1 Fermentationsvolumen
12,4 mg Virus/Virusantigen.

Beispiel 2

Vero-Zellen (ATCC CCL 81) wurden in einem 40-l-Fermenter auf Microcarrier (Cytodex 3 der Firma Pharmacia) bei 37°C bis zu einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml kultiviert und nach Infektion mit FSME-Virus (0,1 pfu/Zelle) kontinuierlich mit Medium (DMEM) (0,33 Vol/Fermentervolumen/Tag) perfundiert.

Tabelle 4

Tag nach Infektion	Virus/Virusantigen
	µg/ml

2	1,60
3	3,50
4	5,00
5	4,30
6	4,00
7	2,90
8	2,70
9	2,10
10	2,00

Die Produktivität betrug pro 1 Fermentationsvolumen
10,7 mg Virus/Virusantigen.

Beispiel 3

Vero-Zellen (ATCC CCL 81) wurden in einem 40-l-Fermenter auf Microcarrier (Cytodex 3 der Firma Pharmacia) bei 37°C bis zu einer Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml kultiviert und nach Infektion mit FSME-Virus (0,1 pfu/Zelle) kontinuierlich mit Medium (DMEM) (1 Vol/Fermentervolumen/Tag) perfundiert.

Tabelle 5**Tagen nach Infektion****Virus/Virusantigen** **$\mu\text{g}/\text{ml}$**

2	1,10
3	3,80
4	3,90
5	3,00
6	2,30
7	2,20
8	2,00
9	3,15 **)
10	2,30

**) Perfusionsrate wurde auf 0,5 V/Fermenter-volumen/Tag reduziert

Die Produktivität betrug pro 1 Fermentationsvolumen
21,7 mg Virus/Virusantigen.

Beispiel 4

Vero-Zellen (ATCC CCL 81) wurden in 150-l-Fermenter auf Microcarrier (Cytodex 3 der Firma Pharmacia) bei 37° C bis $2 \times 10^6/\text{ml}$ kultiviert und nach Infektion mit FSME-Virus (0,1 pfu/Zelle) kontinuierlich mit Medium (DMEM) (0,33 Vol/Fermentervolumen/Tag) perfundiert.

Tabelle 6**Tagen nach Infektion****Virus/Virusantigen** **$\mu\text{g}/\text{ml}$**

2	0,20
3	1,90
4	2,40
5	4,80

12

Fortsetzung Tabelle 6 Tage nach Infektion	Virus/Virusantigen μg/ml
--	-----------------------------

6	5,40
7	4,10
8	4,40
9	3,20
10	4,50

Die Produktivität betrug pro 1 Fermentationsvolumen
14,7 mg Virus/Virusantigen.

Patentansprüche:

1. Matrix mit daran adhärent gebundenen menschlichen oder tierischen, virusinfizierten Zellen zur Produktion von Virus/Virusantigen.
2. Matrix nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als adhärent gebundene Zellen Vero-Zellen ATTC CCL 81 vorgesehen sind.
3. Matrix nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die adhärent gebundenen Zellen mit Frühsommer-Meningo-enzephalitis-(FSME)-Virus infiziert sind.
4. Matrix nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die adhärent gebundenen Zellen mit Flavivirus oder mit Arenavirus infiziert sind.
5. Matrix nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Glas, quervernetztem Dextran, Gelatine oder Kunststoff besteht.
6. Matrix nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Microcarrier ausgebildet ist.
7. Matrix nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß an ihrer Oberfläche pro cm² zwischen 1x10⁵ und 4x10⁵ Zellen adhärent gebunden sind.
8. Verfahren zur Produktion von Frühsommer-Meningoenzephalitis-(FSME)-Virus-Antigen unter Verwendung einer Matrix nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß oberflächenabhängige permanente Zellen, vorzugsweise die Vero-Zellen ATTC CCL 81, mit dem FSME-Virus beimpft werden und die Zellen in einem

serumfreien Medium unter Aufrechterhaltung ihrer Lebensfähigkeit an einer Matrix adhären gebunden gehalten werden, um eine Antigenbildung in den Zellen und eine Antigenabgabe an das Medium aufrecht zu erhalten, worauf das antigenhältige Medium von den trägergebundenen Zellen getrennt und in bekannter Weise durch Aufkonzentrieren, Inaktivieren und Reinigen zu einem galenisch akzeptablen Präparat aufgearbeitet wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Virusvermehrung und Antigenbildung in einem kontinuierlich betriebenen Perfusionsreaktor während einer Dauer von mindestens 5 Tagen bei einer Temperatur zwischen 34 und 37°C durchgeführt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Perfusion mit einer Perfusionsrate von 0,3 bis 10 v/v/Tag durchgeführt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß im Perfusionsreaktor eine Zelldichte von 2×10^9 bis 2×10^{10} Zellen pro Liter Fermentationsvolumen, letztere bei einem Fließbett-Fermenter, vorgesehen wird.

12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß im Medium eine Virus/Virusantigenkonzentration von 1 bis 10 µg/ml aufrecht erhalten wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/AT90/00128

I. CLASSIFICATION & SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl.5 C12N 5/00, A61K 39/12

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ?

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl.5	C12N

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*

Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	GB, A, 2059991 (PHARMACIA FINE CHEMICALS AB) 29 April 1981 see page 3, lines 20-34	1-7
Y	---	8-12
Y	FR, A, 2444466 (IMMUNO AG FUR CHEMISCHE MEDIZINISCHE PRODUKTE) 18 July 1980 see page 1, line 12- page 4, line 14	8-12
A	GB, A, 2094832 (DAMON CORP.) 22 September 1982 ---	
A	EP, A, 0066726 (PHARMACIA FINE CHEMICALS AB) 15 December 1982 ---	
A	GB, A, 2151610 (KMS FUSION) 24 July 1985 ---	
A	EP, A, 0239648 (NAUCHNO-PROIZVODSTVENNOE OBIEDINENIE 'BIOLAR' et al) 7 October 1987	

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

26 March 1991 (26.03.91)

Date of Mailing of this International Search Report

26 April 1991 (26.04.91)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

AT 9000128
SA 42977

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 23/04/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB-A- 2059991	29-04-81	SE-B-	445116	02-06-86
		DE-A, C	3033885	02-04-81
		FR-A, B	2464994	20-03-81
		JP-B-	1054992	21-11-89
		JP-A-	56051981	09-05-81
		SE-A-	7907573	13-03-81
FR-A- 2444466	18-07-80	AT-A-	358167	25-08-80
		BE-A-	880732	16-04-80
		CH-A-	644271	31-07-84
		DE-A, C	2950004	03-07-80
		GB-A, B	2038179	23-07-80
		SE-B-	447789	15-12-86
		SE-A-	7910054	23-06-80
		SU-A-	1318149	15-06-87
GB-A- 2094832	22-09-82	BE-A-	892478	01-07-82
		CA-A-	1172586	14-08-84
		CH-A-	662363	30-09-87
		DE-A, C	3209098	04-11-82
		FR-A, B	2501715	17-09-82
		JP-C-	1313474	28-04-86
		JP-A-	57202289	11-12-82
		JP-B-	60038111	30-08-85
		SE-B-	452335	23-11-87
		SE-A-	8201555	14-09-82
		US-A-	4495288	22-01-85
EP-A- 0066726	15-12-82	CA-A-	1187433	21-05-85
		JP-A-	57194785	30-11-82
		SE-A-	8103138	20-11-82
GB-A- 2151610	24-07-85	CA-A-	1206900	01-07-86
		DE-A-	3341772	30-05-85
		FR-A-	2518569	24-06-83
		GB-A, B	2112377	20-07-83
		SE-B-	452892	21-12-87
		SE-A-	8300990	24-08-84

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**AT 9000128
SA 42977

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 23/04/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0239648	07-10-87	JP-T- 63501474 WO-A- 8702056	09-06-88 09-04-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/AT 90/00128

I. KLASSEFAKTION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Cl.	C 12 N 5/00, A 61 K 39/12	
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem : Klassifikationsymbole		
Int.Cl.	C 12 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13
X	GB, A, 2059991 (PHARMACIA FINE CHEMICALS AB) 29. April 1981 siehe Seite 3, Zeilen 20-34	1-7
Y	--	8-12
Y	FR, A, 2444466 (IMMUNO AG FÜR CHEMISCHE MEDIZINISCHE PRODUKTE) 18. Juli 1980 siehe Seite 1, Zeile 12 - Seite 4, Zeile 14	8-12
A	--	
A	GB, A, 2094832 (DAMON CORP.) 22. September 1982	
A	--	
A	EP, A, 0066726 (PHARMACIA FINE CHEMICALS AB) 15. Dezember 1982	
A	--	
A	GB, A, 2151610 (KMS FUSION) 24. Juli 1985	./.
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
26. März 1991		26. 04. 91
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevoilimächtigten Bediensteten
Europäisches Patentamt		

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (in Zusetzung von Blatt 2)		Betr. Anspruch Nr.
Art	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	
A	EP, A, 0239648 (NAUCHNO-PROIZVODSTVENNOE OBIEDINENIE 'BIOLAR' et al.) 7. Oktober 1987	

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

AT 9000128
SA 42977

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patendokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 23/04/91.
Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB-A- 2059991	29-04-81	SE-B- 445116 DE-A,C 3033885 FR-A,B 2464994 JP-B- 1054992 JP-A- 56051981 SE-A- 7907573	02-06-86 02-04-81 20-03-81 21-11-89 09-05-81 13-03-81
FR-A- 2444466	18-07-80	AT-A- 358167 BE-A- 880732 CH-A- 644271 DE-A,C 2950004 GB-A,B 2038179 SE-B- 447789 SE-A- 7910054 SU-A- 1318149	25-08-80 16-04-80 31-07-84 03-07-80 23-07-80 15-12-86 23-06-80 15-06-87
GB-A- 2094832	22-09-82	BE-A- 892478 CA-A- 1172586 CH-A- 662363 DE-A,C 3209098 FR-A,B 2501715 JP-C- 1313474 JP-A- 57202289 JP-B- 60038111 SE-B- 452335 SE-A- 8201555 US-A- 4495288	01-07-82 14-08-84 30-09-87 04-11-82 17-09-82 28-04-86 11-12-82 30-08-85 23-11-87 14-09-82 22-01-85
EP-A- 0066726	15-12-82	CA-A- 1187433 JP-A- 57194785 SE-A- 8103138	21-05-85 30-11-82 20-11-82
GB-A- 2151610	24-07-85	CA-A- 1206900 DE-A- 3341772 FR-A- 2518569 GB-A,B 2112377 SE-B- 452892 SE-A- 8300990	01-07-86 30-05-85 24-06-83 20-07-83 21-12-87 24-08-84

EPO FORM 10473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

AT 9000128
SA 42977

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 23/04/91.
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0239648	07-10-87	JP-T- 63501474 WO-A- 8702056	09-06-88 09-04-87

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

